

РОЛЬ ФЕРРО-И ФЕРРИ-ФОРМ ГЕМОГЛОБИНА В ОБМЕНЕ ОКСИДА АЗОТА

Степура И.И.

Институт биохимии НАН Беларуси г. Гродно

The oxidation of hemoglobin solutions or erythrocyte suspension containing a mixture of deoxyHb and oxyHb by NaNO_2 (under decreased partial pressure of dissolved oxygen) resulted in the generation of metHb and nitrosoHb. The maximum amount of nitrosoHb was generated during the oxidation of deoxyHb. An increase of oxygen content was accompanied with increased generation of metHb, which was the only hemoglobin form under aerobic conditions. MetHb forms unstable complexes with NO. These complexes catalyze formation of S-nitrosothiols.

NO играет важную роль в сердечно-сосудистой системе, обеспечивая расширение сосудов и регуляцию артериального давления [1]. В эритроцитах оксид азота быстро реагирует с оксигемоглобином с образованием метгемоглобина [2], с дезоксигемоглобином образует нитрозогемоглобин Hb(II)NO . Поэтому достаточно долгое время считалось, что эритроциты выступают только как ловушка оксида азота, инактивируя его избыток в организме.

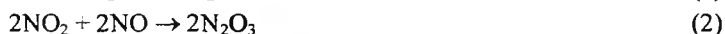
Позднее Stamler и сопр. [3-5] предположили, что эритроциты играют важную роль в доставке оксида азота, продуцируемого в больших артериях к капиллярам, и тем самым обеспечивают регуляцию кровотока. Предложенная ими модель базировалась на возможности связывания оксида азота, выделившегося из артериальных эндотелиальных клеток с катионом железа дезоксигемоглобина, присутствующего в крови в очень малом количестве, с образованием нитрозогемоглобина, а также с 93 остатком цистеина β -цепи с образованием S-нитрозогемоглобина. Предполагалось, что сродство этих двух центров на молекуле гемоглобина к оксиду азота зависит от конформации макромолекулы. В Т-конформации дезоксигемоглобина молекула оксида азота наиболее сильно связывается с гемом дезоксигемоглобина, а в R-конформации с 93-остатком цистеина β -цепи. Дестабилизация оксида азота, связанного с цистеином, при дезоксигенации гемоглобина приводит к переносу оксида азота к мембрано-связанным низкомолекулярным тиолам и, как следствие, к усилению доставки оксида азота к клеткам мишеням. Однако данная гипотеза впоследствии оказалась несостоятельной [6]. Независимыми исследованиями показано, что оксид азота, связанный с дезоксигемоглобином не может переноситься к остатку цистеина с образованием HbSNO , а переход $R \rightarrow T$ конформация не может вызвать высвобождение NO из состава HbSNO [7].

Недавно методом хемилюминесценции показана наличие нестабильных комплексов оксида азота с метгемоглобином в крови и предполагается, что они играют важную роль в регуляции кровотока [8]. Авторы предполагают, что их модель, с учетом реакции восстановления нитрита в оксид азота под действием дезоксигемоглобина [9], может явиться альтернативой гипотезе Stamler и сотр. [3-5].

В данной работе мы исследовали роль ферро- и ферри-форм гемоглобина в трансформации нитрита, а также оксида азота и его редокс форм в водных растворах и в составе эритроцитов. Мы показали, что нестабильные комплексы метгемоглобина с оксидом азота катализируют образование S-нитрозотиолов, которые являются транспортной формой оксида азота и важнейшим компонентом лабильного депо оксида азота в организме.

Восстановление нитрита до оксида азота дезоксигемоглобином

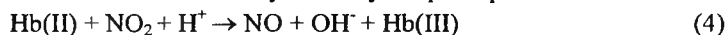
Вследствие взаимодействия оксида азота с кислородом образуется нитрит. Это связано с протеканием следующих реакций между оксидом азота и молекулами кислорода.



Содержание нитрита в крови в среднем обычно составляет 500 нМ.

При понижении парциального давления кислорода происходит диссоциация O_2 , связанного с гемоглобином, и увеличивается в растворе равновесная концентрация дезоксигемоглобина. Ранее показано, что дезоксигемоглобин в анаэробных условиях восстанавливает нитрит до оксида азота, что легко регистрируется по образованию нитрозогемоглобина [9].

Образование нитрозоHb сопровождается сдвигом полосы Core с 433 нм в спектре поглощения исходного дезокси-Hb до 418 нм, соответственно. Асимметричная полоса при 560 нм, характерная для дезокси-Hb, заменяется полосой с максимумами при 545 нм и 574 нм, отличающейся по своей форме от оксиHb и карбоксиHb. Поэтому можно предположить, что дезоксиHb, восстанавливает ионы NO_2^- в NO и этот процесс можно описать следующей суммарной реакцией.



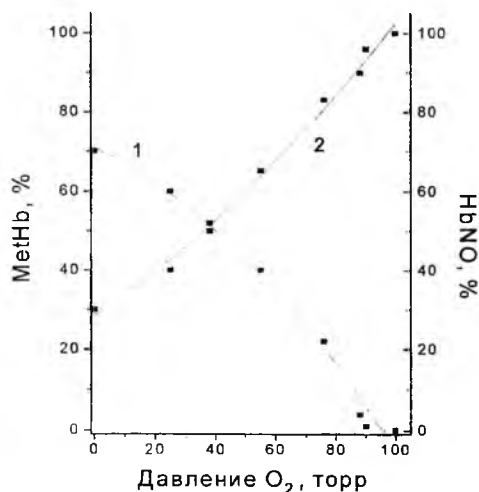


Рис. 1. Зависимость образования и нитрозоHb (1) и мет-Hb (2) при инкубации гемоглобина с нитритом от давления воздуха (мм.рт.ст.). Концентрация Hb = $1,6 \cdot 10^{-5}$ M, $\text{NaNO}_2 = 7,5 \cdot 10^{-5}$ M, 0,05M, Na-фосфатный буфер, pH 7,4. Время инкубации Hb с NaNO_2 составляло 60 минут.

Начальная стадия этой реакции, вероятно, связана с образованием протонированного комплекса нитрита с ферро-катионом дезоксигемоглобина (Hb-Fe(II)-ONOH), который затем расщепляется с образованием иона гидроксила и иона нитрозония. Образовавшийся ион нитрозония ассоциирован с феррокатионом дезоксигемоглобина.



Комплекс ферро-катиона молекулы дезоксигемоглобина с ионом нитрозония находится в равновесии с комплексом феррикатиона молекулы метгемоглобина с оксидом азота.

Переход между этими состояниями протекает очень быстро.



Так как равновесная константа ассоциации оксида азота с ферро-катионом дезоксигемоглобина очень высока, и значительно превышает константу ассоциации оксида азота с ферри-катионом, в молекуле метгемоглобина, то происходит перенос оксида азота на ферро-катион дезоксигемоглобина. Это приводит к образованию нитрозо-Hb.

Образование нитрозо-Hb сильно снижается при повышении давления O_2 в растворе, а уровень метHb возрастает (рис. 1).

Известно, что оксиHb или оксиMb катализируют, практически полное, превращение NO_2^- в NO_3^- [10]. Таким образом, максимальный выход нитрозоHb наблюдается при отсутствии конкурирующих реакций, т.е. при минимальном значении давления кислорода и, следовательно, при практически полном отсутствии оксиHb.

Восстановление нитрита дезоксигемоглобином в составе эритроцитов

Для эритроцитов с понижением давления наблюдаются, примерно, те же закономерности в образовании мет- и нитрозоHb под действием NO_2^- (рис. 1). Нитрит проникает внутрь эритроцитов и взаимодействует с оксигемоглобином с образованием метгемоглобина и нитрата.

Отличия заключаются в том, что образование дезоксиHb происходит при больших значениях парциального давления O_2 в растворе и значение P_{50} возрастает. Понижение сродства O_2 к Hb в эритроцитах вызвано влиянием органических фосфатов: 2,3-дифосфоглицерата, ATP, ADP, которые, связываясь в активном центре Hb, вызывают конформационный переход из R- в T- конформацию, характеризующуюся низким сродством к O_2 . Кроме того, в эритроцитах замедляются скорости окисления окси- и дезоксиHb в метHb и нитрозоHb, соответственно, в сравнении с водными растворами ферро-форм Hb. Мы предполагаем, что это связано с влиянием внутриклеточных антиоксидантов, в первую очередь, GSH (содержание его приблизительно 10^{-3} М), который окисляется в GSSG под действием NO_2^- и др. радикалов, которые возникают при воздействии нитрита на ферро-формы Hb.

Восстановление метгемоглобина оксидом азота

При воздействии оксида азота (в отсутствие кислорода) на метHb, происходит его восстановление с образованием нитрозогемоглобина. Дезоксигемоглобин в качестве промежуточной формы мы не зарегистрировали спектрофотометрическим методом.

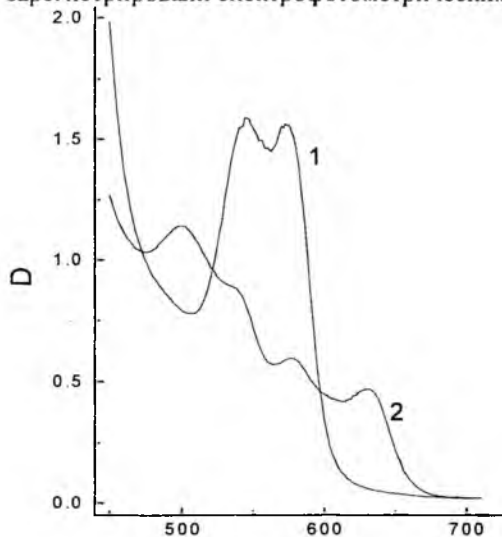


Рис 2. Образование нитрозоHb при воздействии оксида азота на Hb(III). Исходный спектр поглощения Hb(III) - (2), после воздействия оксида азота в течение 30 мин. - (1). Оксид азота получали смешиванием аскорбиновой кислоты и нитрита в модифицированном сосуда Варбурга.

Длина волны, нм

Скорость образования нитрозогемоглобина из метгемоглобина возрастала при добавлении к водным раствору метгемоглобина в анаэробных условиях тиольных соединений цистеина, глутатиона.

При воздействии окиси азота (в отсутствие кислорода) на метНв, происходит его восстановление в ферро-форму- дезокси Нв, который очень быстро связывает NO. Поэтому в наших условиях эксперимента наблюдалось образование только нитрозогемоглобина (рис. 2). Мы предполагаем, что восстановление метгемоглобина и образование нитрозогемоглобина протекают в несколько стадий. На первом этапе образуется комплекс оксида азота с метгемоглобином.



А затем, вследствие переноса электрона, формируется комплекс Hb(II)NO^+ .

Переход между этими состояниями протекает очень быстро.



NO^+ в составе этого комплекса эффективно взаимодействует с различными нуклеофилами, анионами гидроксидов, особенно, с тиолами (рис. 3).

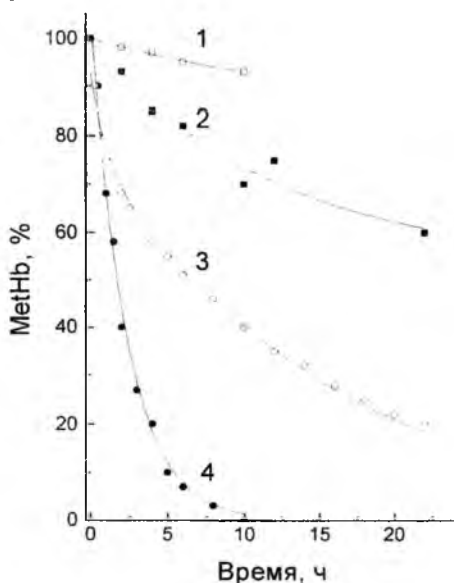
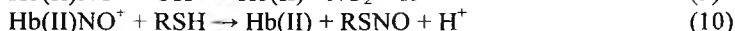
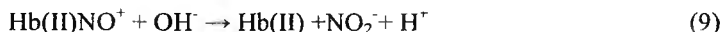


Рис. 3. Кинетика восстановления мет-Нв под действием оксида азота и смеси оксида азота с атмосферным воздухом при различных парциальных давлениях (1)- давление атмосферного воздуха- 300 мм рт.ст., (2)- давление атмосферного воздуха 150 мм рт.ст., (3)- давление атмосферного воздуха 75 мм рт.ст., (4)- давление атмосферного воздуха 37 мм рт.ст.



Образовавшийся дезоксиНв с высокой скоростью (константа скорости $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) взаимодействует с оксидом азота и, поэтому, в

качестве промежуточного продукта не фиксируется. Образуется в качестве конечного соединения нитрозоHb.



В атмосфере воздуха мы не наблюдали восстановления метHb и образования нитрозогемоглобина. Это, вероятно, связано с быстрым превращением NO в NO₂ и N₂O₃ в атмосфере воздуха. Только после понижения атмосферного давления до 380 мм рт.ст. наблюдался процесс восстановления метHb в ферро-форму (нитрозогемоглобин) (рис. 3). Дальнейшее понижение атмосферного давления сопровождалось возрастанием скорости восстановления метHb. Максимальную скорость восстановления метHb под действием оксида азота наблюдали в анаэробных условиях.

Обсуждение результатов

Суммируя полученные результаты, можно высказать предположение, что нитриты восстанавливаются до оксида азота, дезоксигемоглобином, который окисляется в метгемоглобин (реакция 4, рис. 1). Образовавшийся метгемоглобин в анаэробных условиях или при низком содержании кислорода восстанавливается в дезоксигемоглобин (рис. 2-3). Реакция протекает через промежуточную стадию образования нестабильных комплексов (реакции 7-8).

Эти комплексы метгемоглобина с оксидом азота в присутствии тиолов катализируют образование – нитрозотиолов (реакция 9-10). GSH, который присутствует в эритроцитах при физиологических условиях в концентрации больше чем 1 мМ, вероятно, может образовывать S-нитрозоглутатион по данному механизму, вследствие взаимодействия с комплексами метгемоглобина с оксидом азота. Уровень нитритов в организме может поддерживаться не только за счет получения их с лекарственными препаратами, но и в результате активности синтаз оксида азота. Как известно, оксид азота, продуцируемый синтетазой оксида азота из клеток эндотелия, частично захватывается клеточными-мишенями, такими как, например, гемсодержащая гуанилатциклаза, а остальная его часть быстро инактивируется кислородом, и вследствие последующего взаимодействия с водой, образует нитрит (реакции 1-4). При попадании его в артериальную кровь, которая богата кислородом (содержание оксиHb > 90 %), происходит быстрое окисление нитрита в нитрат. Если же ткани обладают повышенным уровнем метаболизма (усиленно потребляют кислород), то доля дезоксиHb возрастает. Кроме того, давление кислорода у венозного конца капилляра составляет, приблизительно 25-28 мм рт.ст., что, примерно, соответствует значению P₅₀, когда содержание дезоксигемоглобина равно содержанию оксигемоглобина в составе эритроцитов. Повышение скорости метаболизма сопровождается усилением выделения CO₂ и, как следствие, локальным понижением рН,

что приводит к усилению выделения O_2 , к возрастанию скорости взаимодействия NO_2^- с дезоксиHb и образованию NO. NO-гидрофобное соединение, может легко диффундировать через мембрану эритроцитов в клетки эндотелия и вызывать релаксацию сосудов.

Вероятно, существует определенная связь между тканевым метаболизмом и кровотоком, реализуемая через взаимодействие окислов азота и нитрита с ферро-формами Hb. ДезоксиHb, и метгемоглобин, вероятно, играют важную роль в процессе тканевой ауторегуляции кровотока, наряду с тиольными соединениями.

Мы предполагаем, что дезоксиHb не только снижает уровень NO в крови, образуя нитрозоHb, но, окисляясь до метHb, является источником окиси азота в реакции с нитритом. Метгемоглобин не является инертной формой гемоглобина, а катализирует образование нитрозоглутатиона и нитрозоцистеина, а следовательно, играет важную роль в регуляции транспорта кислорода.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ, грант БОЗМС-058.

Литература

1. Ignarro, L.J., Cirino G., Casini A. and Napoli, C. (1999) J. Cardiovasc. Pharmacol. 34, 879-886.
2. Eich, R.F., Li, T., Lemon, D.D., Doherty, D.D., Curry, S.R. et all. (1996) *Biochemistry*, 35, 6976-6983
3. Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J.S. // *Nature*.- 1996.- v.380.- p.221-2262
4. McMahon T.J., Stone A.E., Bonaventura J., Singel D.J., Stamler J. (2000) J. Biol. Chem., v. 275.- p.16738-16745.
5. Gow. A. J.m Luchsinger B.P., Pawlowski J.R., Singel D.J., Stamler J, Proc. Natl. Acad. Sci USA.- 1999.- v.96.- p.9027- 9032.
6. Galdwin M. T., Ognibene F. P., Pannell, L. K., Nichols J. S.et all (2000) Proc. Natl. Acad. Sci USA.- 1999.- v.97.- p.9943- 9948.
7. Wolzt M, MacAllister R. J. Davis D. Feelisch M., Moncada S. Vallance P. and Hoobbs A. J. (1999) J. Biol. Chem., v. 274.- p.28983-28990.
8. Nagababu E, Ramasamy S, Darrell R., Abernethy D R., Rifkind J. M. (2003) JBC, p. 1-28.
9. Степуро И.И., Чайковская Н.А, Солодунов А.А, Арцукевич А.Н. // Биохимия.- 1997.- т. 62.- с. 1122-1129.
10. Ignarro, L.J., Fucuto, J.M., Griscavage, J.M., Rogers, N.E., Burns R.E. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8103-8107.